

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02210

研究課題名(和文) タバコモザイクウイルスRNA複製複合体前駆複合体形成機構の解析

研究課題名(英文) Studies on early stages of tobacco mosaic virus replication complex formation

研究代表者

石川 雅之 (Ishikawa, Masayuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・ユニット長

研究者番号：70192482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：タバコモザイクウイルス(TMV)はウイルス粒子内に1本鎖RNAゲノムをもつ。TMVが宿主細胞に感染すると、ゲノムRNAが翻訳されて、130Kタンパク質および180Kタンパク質(RNAポリメラーゼ)が合成される。130Kタンパク質は翻訳と共役してゲノムRNAの5'末端近傍領域に結合し、次いで180Kタンパク質をリクルートしてPMTCと呼ばれる複合体を形成し、ゲノムRNAを複製経路に導く。本研究では、ゲノムRNA 5'末端への塩基挿入がPMTC形成を亢進することを明らかにするとともに、180Kタンパク質がタンパク質間の相互作用を介してPMTCにリクルートされることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMVは、多くの重要な動植物病原体を含むプラス鎖RNAウイルスの一種である。このグループのウイルスは、宿主細胞への感染後、ゲノムRNAの複製にかかわる一群のタンパク質(複製タンパク質)を合成する。それらのタンパク質は互いに、あるいは、宿主因子と協調してゲノムRNAを特異的に複製する。複製タンパク質による鋳型の選択はウイルス感染の鍵ステップとなっており、その過程の理解は感染の人為的コントロールに向けて重要であり、本研究は当該過程の細部を明らかにしようとするものである。

研究成果の概要(英文)：Tobacco mosaic virus (TMV) has a single-stranded RNA genome in virions. The genomic RNA is translated in host cells to produce a 130-kDa protein and its read-through product, a 180-kDa protein (RNA polymerase). The 130-kDa protein co-translationally binds to a 5' terminal region of the genomic RNA and then recruits the 180-kDa protein to form a ribonucleoprotein complex named PMTC. This process is followed by genomic RNA replication. In this study, we found that insertion of a few nucleotides to the 5' terminus of the genomic RNA facilitates PMTC formation and that the 180-kDa protein is recruited to the PMTC via protein-protein interaction.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルス 複製 RNA タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タバコモザイクウイルス (TMV) は代表的な植物プラス鎖 RNA ウィルスで、5' 末端にキャップ構造を有する約 6400 ヌクレオチドの 1 本鎖 RNA をゲノムとしてもつ。TMV が宿主細胞に感染すると、ゲノム RNA が翻訳され、複製に関与する 130K およびそのリードスルー産物である 180K タンパク質が合成される。130K タンパク質は RNA の 5' キャッピングを司るメチルトランスフェラーゼ・グアニリルトランスフェラーゼ様ドメインとヘリカーゼ様ドメインをもち、180K タンパク質はそれらに加えてポリメラーゼ様ドメインをもつ (図 1 A)。

我々は、タバコ脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いた試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系を開発した (Komoda *et al.* 2004. PNAS 101: 1863-1867)。生体膜を除去した BYL (mdBYL) 中で TMV RNA を翻訳すると、130K、180K タンパク質およびゲノム RNA を含む非膜結合性複合体 (pre-membrane-targeting complex: PMTC) が形成された (図 1 B) (Komoda *et al.* 2007. J. Virol. 81: 2584-2591)。PMTC は TMV RNA の翻訳と共役して形成され、それ自身は RNA 合成活性を示さなかったが、BYL 由来の生体膜と混合すると活性のある複製複合体を形成した。PMTC において複製タンパク質は TMV RNA の 5' 末端近傍の約

70 ヌクレオチドの領域 (以下、「標的領域」と呼ぶ) に結合し、この領域をヌクレアーゼの分解から保護した (Kawamura-Nagaya *et al.* 2014. PNAS 111: E1620-E1628)。130K タンパク質のみをコードする TMV-130 RNA (180K タンパク質リードスルー部分を欠失: 図 1 A) を mdBYL で翻訳すると、翻訳と共役して PMTC 様の複合体が形成され、その複合体 (「core PMTC」と呼ぶ) を 180K タンパク質および BYL 由来の生体膜と混合すると TMV-130 RNA の複製が起きた。TMV RNA と結合しなかった 130K タンパク質を翻訳停止後に TMV RNA と混合しても PMTC は形成されなかったが、130K タンパク質から Hel ドメインを欠失させた MetIR 断片は、mdBYL で合成後、翻訳停止後に標的領域 RNA と混合すると、約 1 MDa の複合体 (形成された複合体を「1 MDa 複合体」と呼ぶ) を形成した。これらの知見から、(i) PMTC は複製複合体の前駆複合体である; (ii) 130K タンパク質の TMV RNA への結合は、同タンパク質の合成途上、MetIR 領域の合成が完了し、かつ、Hel 領域が完成する前に起きる; (iii) 180K タンパク質は core PMTC に組み込まれ、PMTC を形成すると考えられた (図 1 B)。

### 2. 研究の目的

本研究は、TMV の RNA 複製機構の理解に向けて、複製複合体前駆複合体 PMTC の形成機構の解明を目的とした。具体的には、PMTC 形成の効率に影響を与える標的 RNA の構造と宿主因子に関する情報を得るとともに、core PMTC への 180K タンパク質のリクルートメント機構を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

BYL あるいは mdBYL を用いた試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系を利用した生化学的手法を用いた。標的 RNA に結合するタンパク質は、標的の 3' 末端側にストレプトマイシン結合性アプタマーである StreptoTag (Fujisaki & Ishikawa, 2008. Virology 380: 402-411) を融合した RNA を、ストレプトマイシンを共有結合したセファロースビーズに固定したものに、脱液胞化シロイヌナズナプロトプラスト抽出液を添加、保温、洗浄後、ストレプトマイシンによる溶出を行い、精製した。タンパク質の同定は、専門業者に委託して、LC-MS/MS 法により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 試験管内複製および PMTC 形成の効率に影響を与える要因の解析

本研究において、植物から精製したウイルス粒子由来の TMV RNA に比して試験管内転写で合成した RNA の PMTC 形成効率が低いという問題に直面した。このことは、PMTC の形成機構の解

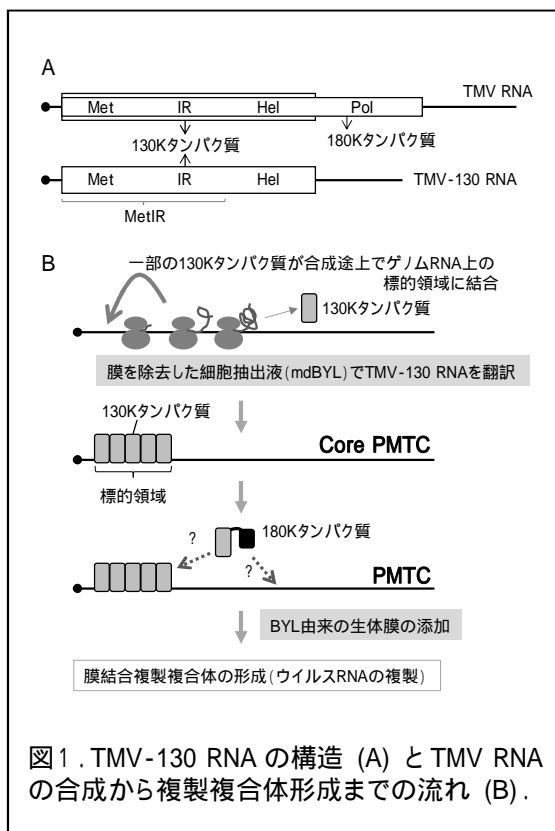


図1. TMV-130 RNA の構造 (A) と TMV RNA の合成から複製複合体形成までの流れ (B)。

析にとって大きな問題となるため、以下の3つの項目を検討することにより、PMTC形成効率を上げる手段を模索した。

TMV RNAの5'末端近傍領域はPMTC形成の核となるが、そこにはアデニンの6位アミノ基のメチル化コンセンサス配列が2個存在する。そこで、 $m^6A$ 特異的抗体を用いてウイルス粒子由来TMV RNAの当該領域のメチル化の有無を検討したが、メチル化は検出されなかった。また、それらコンセンサス配列に変異を導入してもPMTC形成効率に大きな変化はなく、PMTC形成へのアデニンN6-メチル化の関与は示唆されなかった。

転写産物の3'末端構造の比感染価に及ぼす影響を明らかにするために、制限酵素処理により線状化したプラスミドDNA、あるいはTMV RNAの3'末端2ヌクレオチドに相当する部分に2'-メトキシ基を導入したプライマーを用いてPCRで合成したDNAを鋳型として合成したRNA（前者は3'末端に数塩基の付加をもつが、後者はもたないと想定される）を、BYLを用いた試験管内翻訳複製反応に付したところ、両者は同程度複製し、その程度は同じ量のウイルスRNAを翻訳複製した場合より顕著に低かった。

5'末端に2個のG残基の挿入をもつ試験管内転写TMV RNAが、挿入をもたないRNA（ウイルス粒子に含まれるTMV RNAは「挿入をもたない」5'末端塩基配列をもつ）よりも高い効率でPMTCを形成することを見いだした。

以上より、標的RNA 5'末端への2個のG残基の付加がPMTC形成効率を上昇させるために有効であることが分かった。

### (2) Core PMTCへの180Kタンパク質のリクルートメント機構の解析

130Kタンパク質のみをコードするTMV-130 RNA（図1A；180Kタンパク質リードスルー部分を欠失；本実験は近縁のトマトモザイクウイルス [ToMV] の配列を用いて行った）をmdBYLで翻訳すると、翻訳と共役してcore PMTCが形成され、さらにこれを180Kタンパク質およびBYL由来の生体膜と混合するとTMV-130 RNAの複製が起きる。180Kタンパク質はcore PMTCに組み込まれ、複製複合体形成に向かうと考えられる。5'末端に2個のG残基の挿入をもつTMV-130 RNAをmdBYLで翻訳して形成させたcore PMTCに180Kタンパク質を添加し、蔗糖密度勾配遠心により解析したところ、180Kタンパク質の一部がcore PMTCと同じ画分に移動することが分かった。この画分を回収し、130Kタンパク質に付したタグで免疫沈降を行うと、180Kタンパク質も共精製された。このことから、180Kタンパク質がcore PMTCに取り込まれたと推測された。180Kタンパク質の130Kタンパク質との共精製はマイクロコッカールヌクレアーゼ処理に抵抗性を示した。このことから、180Kタンパク質はタンパク質間相互作用あるいはマイクロコッカールヌクレアーゼ耐性のRNAとの相互作用を介してcore PMTCに結合すると考えられた。

### (3) MetIR-標的RNA 1 MDa複合体形成にかかわる宿主因子の探索

TMVの130K複製タンパク質の一部であるMetIR断片はゲノムRNAの5'末端近傍の約100ヌクレオチドの領域に結合して約1 MDaの複合体（1 MDa複合体）を形成する。この複合体形成の効率も、標的RNAの5'末端に2個のG残基を挿入することにより高まることを見出した。MetIR PMTC形成効率亢進の原因に関する情報が得られることを期待して、また、PMTC形成に関与する宿主因子が同定できることを期待して、G残基の挿入がないRNAと挿入があるRNAに結合する宿主タンパク質をシロイヌナズナの細胞抽出液から精製し、SDS-PAGE - 銀染色およびLC-MS/MS法により解析した。精製されたタンパク質の組成にG残基の挿入があるRNAとないRNAの間で大きな差はなく、いずれにおいてもBTR1が検出された。BTR1は、標的領域近傍に結合し、ToMVの増殖を阻害する宿主因子として過去の研究で同定されたタンパク質であり（Fujisaki & Ishikawa, 2008. *Virology* 380: 402-411）、標的領域に競合的に結合してPMTCの形成を阻害すると考えられた。また、試験管内翻訳によりMetIR断片を合成したタバコ細胞抽出液からも、同様の精製により、MetIR断片とともにいくつかの宿主タンパク質が得られたが、G残基の挿入があるRNAとないRNAの間で結合タンパク質の組成に大きな差はみられなかった。

精製したMetIRと標的RNAを混合しても1 MDa複合体は形成されず、その形成にはmdBYLの添加が必要であった。このことは、1 MDa複合体の形成には宿主因子が関与することを示唆した。そこで、mdBYLを分画して当該因子を精製し同定する試みを行った。しかし、活性が不安定で、目的は達成できなかった。また、MetIR PMTC形成への分子シャペロンの関与を検討するために、HSP70、HSP90、cyclophilinあるいはFKBPの阻害剤を添加したが、複合体形成への影響はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石橋 和大  (Ishibashi Kazuhiro)		
研究協力者	吉川 学  (Yoshikawa Manabu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関